

Untersuchungen zur sekretorischen Proteingewinnung industriell relevanter Enzyme mit *Corynebacterium glutamicum*

Sandra Scheele

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institute of Bio- and Geosciences (IBG)
Biotechnology (IBG-1)

Untersuchungen zur sekretorischen Protein- gewinnung industriell relevanter Enzyme mit *Corynebacterium glutamicum*

Sandra Scheele

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 56

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-815-0

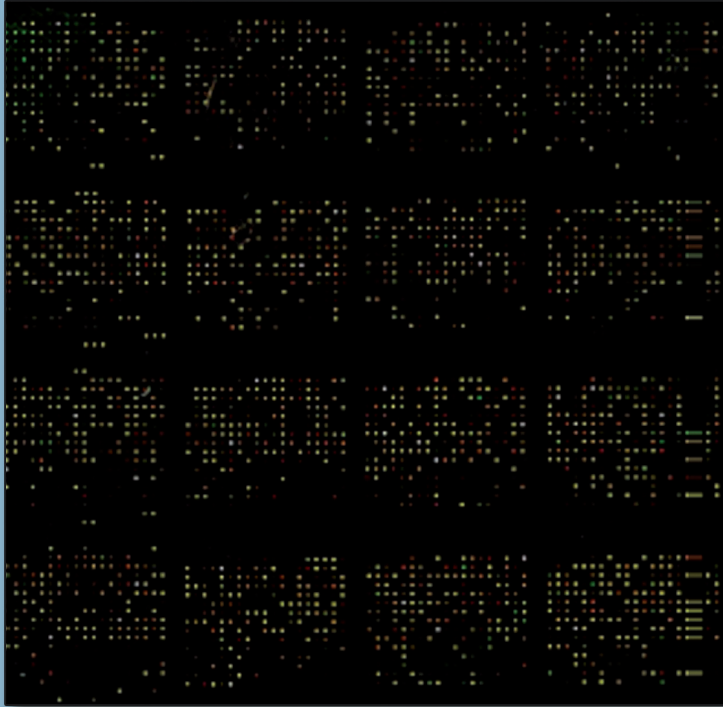
Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	v
<u>1. Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1 Die Produktion industriell relevanter Enzyme mit Hilfe von Bakterien	1
1.1.1 Der generelle Sekretionsweg.....	2
1.1.1.1 Das Targeting an die Sec-Translokase.....	3
1.1.1.2 Die Translokation über die Cytoplasmamembran	4
1.1.1.3 Die Freisetzung des Proteins auf der trans-Seite der Cytoplasmamembran	5
1.1.1.4 Engpässe in der Sec-abhängigen Sekretion wirtsfremder Proteine.....	6
1.1.2 Die Tat-abhängige Proteintranslokation.....	6
1.1.2.1 Der Aufbau des Tat-Signalpeptids	7
1.1.2.2 Komponenten der Tat-Translokase.....	7
1.1.2.3 Die Translokation durch die Cytoplasmamembran.....	8
1.1.2.4 Engpässe in der Tat-abhängigen Translokation wirtsfremder Proteine	10
1.2 Die zelluläre Stressantwort in Bakterien als Reaktion auf die Produktion und Sekretion heterologer Proteine.....	10
1.2.1 Die Rolle von <i>ecf</i> -Sigmafaktoren in Bakterien.....	11
1.2.2 Zwei-Komponenten Systeme.....	13
1.2.3 Die bakterielle <i>heat shock response</i> (HSR)	15
1.2.4 Die <i>phage-shock</i> Antwort.....	18
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	21
<u>2. Material und Methoden.....</u>	<u>22</u>
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	22
2.2 Bakterienstämme, Oligonukleotide und Plasmide.....	22
2.3 Mikrobiologische Methoden	26
2.3.1 Nährmedien.....	26
2.3.2 Kultivierungsbedingungen	27
2.3.3 Indikatoragarplatten mit Stärke zum quantitativen Nachweis von Amylase-Aktivität (nach Smibert <i>et al.</i> , 1981)	28
2.3.4 Indikatoragarplatten mit <i>skim-milk</i> zum quantitativen Nachweis von Protease-Aktivität	28
2.3.5 Indikatoragarplatten mit Tributyrin zum quantitativen Nachweis von Lipase-Aktivität	28
2.3.6 Indikatoragarplatten mit 4-Chloronaphthol und Peroxidase zum quantitativen Nachweis Wasserstoffperoxid-bildender Enzyme wie der Cholinoxidase bzw. der Sorbitol/Xylitol-Oxidase	29
2.3.7 Stammhaltung	29
2.3.8 Transformation von Bakterien.....	29
2.3.8.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	29
2.3.8.2 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Hitzeschock.....	30
2.3.8.3 Herstellung elektrokompeter <i>C. glutamicum</i> Zellen.....	30
2.3.8.4 Elektroporation von <i>C. glutamicum</i> Zellen.....	31

2.4 Molekulargenetische Methoden	31
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA	31
2.4.2 Fällung von DNA aus wäßriger Lösung	32
2.4.3 Entsalzen von DNA	32
2.4.4 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase	32
2.4.5 Präparation chromosomaler DNA	32
2.4.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	33
2.4.7 Agarose-Gelelektrophorese	33
2.4.7.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten	33
2.4.7.2 Auftrennung von Gesamt-RNA	34
2.4.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	35
2.4.9 Aufreinigung von DNA	35
2.4.10 Ligation von DNA-Fragmenten	35
2.4.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.4.11.1 Durchführung der crossover-PCR	36
2.4.12 Nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode	37
2.4.13 RNA-Isolierung	37
2.4.14 Synthese von cDNA	38
2.4.14.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	38
2.4.15 Genomweite Expressionsanalysen (DNA-Microarray-Experimente)	38
2.4.16 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	40
2.5 Proteinchemische Methoden	40
2.5.1 Induktion der Genexpression bei <i>C. glutamicum</i>	40
2.5.1.1 Isolierung von Proteinen aus Gesamtzellextrakten von <i>C. glutamicum</i>	40
2.5.1.2 Aufarbeitung von Kulturüberständen von <i>C. glutamicum</i>	41
2.5.1.3 Extraktion von Proteinen aus der Zellwand von <i>C. glutamicum</i> (Peyret <i>et al.</i> , 1993)	41
2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (variiert nach Lämmli, 1970)	42
2.5.2.1 Coomassie-Färbung von Proteingelen	43
2.5.2.2 Silberfärbung von Proteingelen	43
2.5.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern	43
2.5.4 MALDI-TOF Massenspektroskopie	45
2.5.5 Bestimmung der Amylase-Aktivität mit Hilfe des Phadebas®-Testsystems	45
2.5.6 Photometrische Bestimmung der Protease-Aktivität mittels AAPF-Test	46
2.5.7 Photometrische Lipase-Aktivitätsbestimmung mit <i>para</i> -Nitrophenyl-Estern	46
2.5.8 Photometrische Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration in einem System aus Chromotropsäure, 4-Aminoantipyrin und Meerrettichperoxidase	48
<u>3. Ergebnisse</u>	<u>50</u>
3.1 Charakterisierung von <i>C. glutamicum</i> als Wirtssystem für die sekretorische Enzymgewinnung	50
3.2 Die Produktion von Proteinen und deren Sekretion entlang des Tat-Wegs von <i>C. glutamicum</i>	52
3.2.1 Untersuchung der <i>torA-cod</i> -Expression und der Tat-abhängigen Sekretion der Cholinoxidase durch <i>C. glutamicum</i>	53

3.2.2 Untersuchung der <i>torA-soxy</i> -Expression und der Tat-abhängigen Sekretion der Sorbitol/Xylitol-Oxidase durch <i>C. glutamicum</i>	57
3.2.3 Bewertung der Tat-abhängigen Proteinsekretion zweier Modellenzyme durch <i>C. glutamicum</i>	64
3.3 Die Produktion von Proteinen und deren Sekretion entlang des Sec-Wegs von <i>C. glutamicum</i>	64
3.3.1 Untersuchung der <i>hp70</i> -Expression und der Sec-abhängigen Sekretion der Protease durch <i>C. glutamicum</i>	65
3.3.2 Untersuchung der <i>blapR</i> -Expression und der Sec-abhängigen Sekretion der Protease durch <i>C. glutamicum</i>	67
3.3.3 Untersuchung der <i>lipP</i> -Expression und der Sec-abhängigen Sekretion der Lipase durch <i>C. glutamicum</i>	69
3.3.4 Untersuchung der <i>amyH</i> -Expression und der Sec-abhängigen Sekretion der Amylase durch <i>C. glutamicum</i>	72
3.3.5 Bewertung der Sec-abhängigen Proteinproduktion verschiedener Modellenzyme durch <i>C. glutamicum</i>	77
3.4 Globale Analyse der zellulären Reaktionen von <i>C. glutamicum</i> bei der Sekretion eines Tat- und eines Sec-abhängigen Modellproteins	77
3.4.1 Charakterisierung der cytosolischen Produktion der Sorbitol/Xylitol-Oxidase SoXy in <i>C. glutamicum</i>	79
3.4.2 Charakterisierung der Produktion und Tat-abhängigen Sekretion der inaktivierten SoXy- bzw. TorA-SoXy Varianten durch <i>C. glutamicum</i>	82
3.4.3 Charakterisierung der Produktion der signalpeptidlosen Variante der Amylase AmyH in <i>C. glutamicum</i>	83
3.5 Analyse der Tat- bzw. Sec-abhängigen Sekretion zweier Modellenzyme durch <i>C. glutamicum</i> mit Hilfe von DNA-Microarrays	85
3.6 Analyse der zellulären Reaktionen von <i>C. glutamicum</i> aufgrund der Produktion und Tat-abhängigen Sekretion der Sorbitol/Xylitol-Oxidase mit Hilfe von DNA-Microarrays	86
3.6.1 Zelluläre Reaktionen von <i>C. glutamicum</i> aufgrund von oxidativem Stress	87
3.6.2 Zelluläre Reaktionen von <i>C. glutamicum</i> aufgrund der spezifischen Proteinproduktion der Sorbitol/Xylitol-Oxidase	89
3.6.3 Zelluläre Reaktionen von <i>C. glutamicum</i> aufgrund der Tat-abhängigen Sekretion der Sorbitol/Xylitol-Oxidase	89
3.7. Zelluläre Reaktionen von <i>C. glutamicum</i> aufgrund der spezifischen Proteinproduktion der Amylase AmyH	90
3.7.1 Zelluläre Reaktionen von <i>C. glutamicum</i> aufgrund der Sec-abhängigen Sekretion der Amylase AmyH	92
<u>4. Diskussion</u>	<u>96</u>
4.1 Untersuchung der Tat-abhängigen Proteinsekretion durch <i>C. glutamicum</i>	97
4.1.1 Die Anwendbarkeit von <i>C. glutamicum</i> als Wirtsorganismus für die Tat-abhängige Sekretion heterologer Proteine	98
4.2 Untersuchung der Sec-abhängigen Proteinsekretion durch <i>C. glutamicum</i>	99
4.2.1 Die Anwendbarkeit von <i>C. glutamicum</i> als Wirtsorganismus für die Sec-abhängige Sekretion heterologer Proteine	99

4.3 Zelluläre Reaktionen von <i>C. glutamicum</i> aufgrund der Produktion und Tat-abhängigen Sekretion der Sorbitol/Xylitol-Oxidase	103
4.4 Zelluläre Reaktionen von <i>C. glutamicum</i> aufgrund der Sec-abhängigen Sekretion der Amylase AmyH.....	104
<u>5. Zusammenfassung.....</u>	<u>111</u>
<u>6. Summary.....</u>	<u>112</u>
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	<u>113</u>



Gesundheit / Health
Band / Volume 56
ISBN 978-3-89336-815-0

